

## キクのエチレンレセプター遺伝子の単離・解析とエチレン非感受性形質転換体作成への応用

著者	鳴海 貴子
号	832
発行年	2004
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16613">http://hdl.handle.net/10097/16613</a>

氏 名(本籍)	なる 鳴	み 海	たか 貴	こ 子
学 位 の 種 類	博 士 ( 農 学 )			
学 位 記 番 号	農 博 第 8 3 2 号			
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)			
学 位 論 文 題 目	キクのエチレンレセプター遺伝子の単離・解析とエチレン非感受性形質転換体作成への応用			
論文審査委員	(主 査)	教 授	羽 柴 輝 良	
	(副 査)	教 授	國 分 牧 衛	
		教 授	金 濱 耕 基	
		助教授	佐 藤 茂	

# 論文内容要旨

## 1. 緒言

キクは、栽培の歴史が古く、わが国では出荷量が最も多い経済的に重要な園芸花きである。キクは、エチレンが老化に関与しない花きと考えられてきた。ところが、近年、エチレンに対して感受性を有し、葉の黄化が促進される品種の存在が報告された。エチレンによるキク葉の黄化を抑制する方法として、エチレン非感受性遺伝子組換え体の作出が有効である。今までに、シロイヌナズナの変異エチレンレセプター遺伝子 *etr1-1* を導入した、エチレン非感受性カーネーションとペチュニアの作出がなされている。しかし、キクでは、他生物由来の外来遺伝子が発現しない事例が数多く報告されている。この問題は、キクのエチレンレセプター遺伝子由来の変異遺伝子を導入することによって回避できると考えられる。他方、キクにおいて外来遺伝子を安定して発現するプロモーターとして、タバコのパプチド鎖伸長因子遺伝子のプロモーター (*EF1 $\alpha$*  プロモーター) が開発されている。本研究では、エチレンに対するキクの感受性をエチレンレセプター遺伝子に着目して解析し、さらに、変異エチレンレセプター遺伝子を導入したエチレン非感受性遺伝子組換えキクの作出を行った。

## 2. キクのエチレンレセプター遺伝子 (*DG-ERS1*) cDNA のクローニング

キク葉由来の total RNA を鋳型にして RT-PCR を行い、エチレンレセプター遺伝子の cDNA 断片 (768 bp) を得た。cDNA 断片をプローブにして cDNA ライブラリーをスクリーニングし、1724 bp の部分鎖長 cDNA を得た。さらに、5' RACE を行い 5' 上流配列 (598 bp) を得た。得られた cDNA を再構成し、両端の配列をプライマーにして RT-PCR を行い、全鎖長 cDNA を取得し、*DG-ERS1* とした (GenBank Ac. No. AF547624)。 *DG-ERS1* cDNA は 2427 bp で、81 bp の 5' 非翻訳領域、1920 bp の翻訳領域、426 bp の 3' 非翻訳領域を含んでいた。 *DG-ERS1* は 640 残基のアミノ酸からなる 72 kD のタンパク質と推定された。 *DG-ERS1* は、他植物由来のエチレンレセプター遺伝子に保存されている 3 つの膜貫通領域とヒスチジンキナーゼ領域の 5 つのモチーフを持っていたが、レシーバー領域を持たなかった (図 1)。 *DG-ERS1* は ERS 型のエチレンレセプターと推定された。 *DG-ERS1* のアミノ酸配列は、シロイヌナズナ *ERS1* と 72%、トマト *NR* と 70%、デルフィニウム *DsppERSc1* と 74%、カーネーション *DC-ERS2* と 69% の相同性を有していた。分子

系統樹から、DG-ERS1 はナス科のトマト NR およびタバコ Nt-ERS1 と近縁であることが示された (図 2)。

栽培ギクは 6 倍体で、2 倍体の野生ギクから育種されたものである。2 倍体の野生ギク ‘リュウノウギク’ と、6 倍体の栽培ギク ‘岩の白扇’、‘精興の誠’ を材料にして サザン解析を行った (図 3)。プローブには、DG-ERS1 cDNA の 3 番目の膜貫通領域を含む配列 (300 bp) を用いた。‘リュウノウギク’ では *Eco*R I および *Hind* III 処理によって濃いバンドが 1 本、*Xba* I 処理では 2 本検出された。また、両方の制限酵素処理で、薄いバンドが 2 本以上検出された。薄いバンドは、DG-ERS1 と相同な遺伝子とのクロスハイブリダイゼーションを示すと考えられた。この結果から、2 倍体のギクには、1 個の DG-ERS1 遺伝子と 2 個以上の DG-ERS1 に相同なエチレンレセプター遺伝子が存在することが推定された。

6 倍体ギクの ‘岩の白扇’ と ‘精興の誠’ では、いずれの制限酵素処理によっても、濃いバンドと薄いバンドが複数本ずつ検出されたが、両品種間でバンドの出現パターンが大きく異なり明解な解釈ができなかった。6 倍体の栽培ギクでは DG-ERS1 と DG-ERS1 に相同な遺伝子が複数個ずつ存在することが推定された。いずれの制限酵素で処理した場合にも、2 品種の 6 倍体ギクで検出されたバンドのサイズ (塩基数) は、2 倍体ギクで検出されたバンドのサイズとは異なっていた。この結果から、6 倍体ギクのゲノム DNA は、2 倍体の野生ギクのゲノム DNA が単純に 3 倍になったものではなく、6 倍体栽培ギクの育種過程でゲノム DNA の再編成や脱落が起こったため、ゲノム DNA の構成が細かな点で品種ごとに異なっていると考えられた。

### 3. エチレン感受性ギクと非感受性ギクにおける DG-ERS1 の発現解析

エチレン感受性の ‘精興の誠’ とエチレン非感受性の ‘岩の白扇’ を用いて、自然老化時および外生エチレン処理時の DG-ERS1 mRNA 量の変化を real time PCR によって解析した (図 4)。満開時 (day 0) の ‘精興の誠’ では、舌状花の花冠 (以下、花卉と略記) と葉において DG-ERS1 mRNA が検出された (図 4A)。DG-ERS1 mRNA 量は 0-15 cm の葉で最も少なく、30-45 cm の葉で最も多かった。花卉の DG-ERS1 mRNA 量は、30-45 cm の葉とほぼ同量であった。花卉と 30-45 cm の葉の DG-ERS1 mRNA 量は、自然老化期間 8 日間を通して急激に減少した。この減少

は花卉と葉の老化に関連していると考えられた。day 0 の‘精興の誠’をエチレン処理 ( $2 \mu\text{l}^{-1}$ , 12 時間) すると、花卉と葉の *DG-ERS1* mRNA 量が急激に減少した。エチレン非感受性の‘岩の白扇’の花卉と葉においても、*DG-ERS1* mRNA が検出された (図 4B)。しかし、その量は‘精興の誠’に比べて極めて少なく、自然老化時やエチレン処理時にもほとんど変化しなかった。

エチレンレセプターはネガティブレギュレーターとして働くことが明らかにされている。すなわち、エチレンレセプターは、エチレン非存在下で活性状態にありエチレン応答を惹起しない。他方、エチレン存在下で不活性化され、エチレン応答を引き起こす。エチレンレセプター (および、エチレンレセプター mRNA) の存在量が多いことは、エチレン感受性が低いことを意味する。‘精興の誠’で自然老化時およびエチレン処理によって *DG-ERS1* mRNA 量が減少することは、老化にともなってエチレン感受性が増加することを示唆している。したがって、‘精興の誠’では *DG-ERS1* がエチレン受容に関与していて、その遺伝子の発現の減少がエチレン感受性の増加を引き起こしていることが推定された。‘岩の白扇’では、*DG-ERS1* mRNA 量の顕著な変化が見られないことから、*DG-ERS1* はエチレンの受容に大きな役割を果たしていないと考えられた。

#### 4. 変異エチレンレセプター遺伝子 (*mDG-ERS1 series*) の導入による遺伝子組換え体の作出

カルス形成能と個体再生能が高く、かつ、エチレン感受性として選抜された‘セイマリン’に対して、一群の変異エチレンレセプター遺伝子 (*mDG-ERS1 series*) の導入を行った。*mDG-ERS1 series* は、シロイヌナズナの変異エチレンレセプター遺伝子, *etr1-1*, *etr1-2*, *etr1-3*, *etr1-4*, とトマトの *Nr* に存在する変異 (一塩基置換) を、*in vitro* mutagenesis 法により *DG-ERS1* cDNA に導入して作成した (図 5)。全ての一塩基変異は膜貫通領域に存在し、一アミノ酸置換を引き起こす。*DG-ERS1* と上記の 5 種類の *mDG-ERS1*, 合計 6 種類を、pBIEF1 $\alpha$  ベクターの GUS 遺伝子と置換して、遺伝子導入ベクター (pBIEF1 $\alpha$ /*mDG-ERS1 series*) を作成した (図 6)。pBIEF1 $\alpha$ /*mDG-ERS1 series* は、抗生物質耐性遺伝子として NPT II 遺伝子を持ち、パロモマイシンによる選抜が可能である。各ベクターを *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 に導入し、各ベクター毎に外植

片 1600 枚を用いて遺伝子導入操作を行った。パロモマイシンを含む培地で 2 回選抜した (図 7)。パロモマイシン耐性個体を用いて PCR による導入遺伝子を確認した (図 8)。全体として、再分化シュートが 533 個体得られ、そのうち 412 個体がパロモマイシン耐性であった。パロモマイシン耐性個体の 94%, 386 個体で導入遺伝子を確認された (表 1)。形質転換効率は、各ベクター (コンストラクト) によって違い、2.4~6.2%であった。

## 5. エチレン非感受性個体の選抜と解析

pBIEF1 $\alpha$ /*mDG-ERS1* series を導入した各系統からパロモマイシン耐性を示した 40 個体をランダムに選び、エチレン処理 (5-10  $\mu$ l l<sup>-1</sup>, 6 日間) を行った。‘セイマリン’ では下位葉~中位葉が黄化した。パロモマイシン耐性個体では、‘セイマリン’ と同程度に葉が黄化した個体 (エチレン感受性)、最下葉のみが黄化した個体 (エチレン低感受性)、黄化が一切起こらなかった個体 (エチレン非感受性) に区別された (図 9)。遺伝子導入系統の黄化は、最下葉の黄化度の測定によっても確認された (図 10)。*mDG-ERS1(etr1-4)* 系統のエチレン感受性個体 (No. 27) とエチレン低感受性個体 (No. 14) では、‘セイマリン’ と同様に、エチレン処理 2 日目から 3 日目にかけて急激に黄化が進んだ。エチレン非感受性個体 (No. 33) では黄化度は変化しなかった。

各系統のうち、*mDG-ERS1(etr1-4)* 系統で、最も多くのエチレン非感受性個体を得られた (図 11)。続いて、*mDG-ERS1(etr1-2)*, *mDG-ERS1(etr1-3)*, *mDG-ERS1(Nr)* 系統ではほぼ同数のエチレン低感受性・非感受性個体を得られた。*mDG-ERS1(etr1-1)* 系統では、エチレン非感受性個体は得られず低感受性個体のみが得られた。*DG-ERS1* 系統でもエチレン低感受性・非感受性個体を得られたが、これは導入した *EF1 $\alpha$ ::DG-ERS1* 遺伝子が恒常的に発現して *DG-ERS1* レベルが上昇したため、エチレン感受性が低下したと推定された。

*mDG-ERS1(etr1-4)* 系統のエチレン感受性・低感受性・非感受性の各 3 個体を用いてサザン解析を行い、導入遺伝子を確認した (図 12)。*Hind* III 処理で、‘セイマリン’ では 6 本のバンドが検出されたが、*mDG-ERS1(etr1-4)* 系統の全ての個体で、さらに 1~3 本のバンドが検出された。*Xba* I 処理では、導入遺伝子由来の 1514 bp のバンドが *mDG-ERS1(etr1-4)* 系統の全ての個体で検出された。エ

チレン 感受性個体においても導入遺伝子が確認されたが、これらの個体では導入遺伝子の発現が抑制されていることが推定された。

エチレン非感受性が付与されたペチュニアで、挿し苗の発根能が失われたことが報告されている。 *EF1α::mDG-ERS1* 導入系統の幼植物個体の根を観察した (図 13)。 *mDG-ERS1(etr1-4)* 系統のエチレン感受性 (No. 13) ・低感受性 (No. 45) の個体, *mDG-ERS1(etr1-1)* 系統のエチレン低感受性個体 (No. 23), *mDG-ERS1(Nr)* 系統の個体 (Nos 3, 6) で根の成長が抑制された。遺伝子組換えによって作出した個体は、上に示した少数の個体で根の成長に影響が見られた。大部分の遺伝子組換え体では、根は正常に成長した。さらに、 *mDG-ERS1(etr1-4)* 系統のエチレン低感受性・非感受性個体では、幼植物を土に挿し芽した時は、順調に発根し活着した。また、鉢上げ後の植物体の生育も‘セイマリン’と差がなかった。したがって、今回作成したキクの遺伝子組換え体では、根の成長に対する抑制的影響が若干みられたものの、遺伝子組換えキクの実用化の障害にはならないと考えられた。

## 6. まとめ

キクから 1 種類のエチレンレセプター遺伝子 *DG-ERS1* の cDNA をクローニングした。 *DG-ERS1* mRNA 量は、エチレン感受性品種‘精興の誠’の自然老化時およびエチレン処理時に舌状花の花冠および葉において減少した。エチレン非感受性品種‘岩の白扇’ではこのような減少は観察されなかった。 *DG-ERS1* はエチレン感受性品種‘精興の誠’において、エチレン受容に働いていることが推定された。 *DG-ERS1* cDNA にシロイヌナズナの *etr1-1*, *etr1-2*, *etr1-3*, *etr1-4*, およびトマト *Nr* の変異と同様の一塩基置換を導入した変異エチレンレセプター遺伝子 *mDG-ERS1 series* をタバコのペプチド鎖伸長因子遺伝子のプロモーター (*EF1α* プロモーター) に繋いだコンストラクトを作成し、キク品種‘セイマリン’に導入して遺伝子組換え体を作成した。この結果、 *mDG-ERS1(etr1-4)* が最も効率よくエチレン非感受性を付与できることが明らかになった。本研究において、エチレンレセプター遺伝子 *DG-ERS1* がエチレン受容に働いていることを明らかにし、さらにエチレン非感受性遺伝子組換えキクの作出に成功した (図 14)。

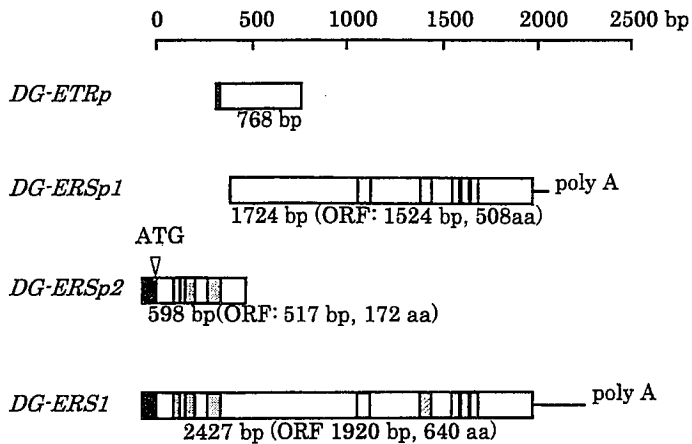


図 1. *DG-ERS1* cDNA のクローニング。

*DG-ETRp*: '岩の白扇' 葉の total RNA から RT-PCR でクローニング

*DG-ERSp1*: '芳香' 花卉由来の cDNA ライブラリーからスクリーニング

*DG-ERSp2*: '芳香' 葉の total RNA から 5'RACE で増幅

*DG-ERS1*: '芳香' 葉の total RNA から RT-PCR で再クローニング

■, 5' 非翻訳領域; □, 膜貫通領域のモチーフ;

□ □ □, ヒスチジンキナーゼ保存領域のモチーフ。

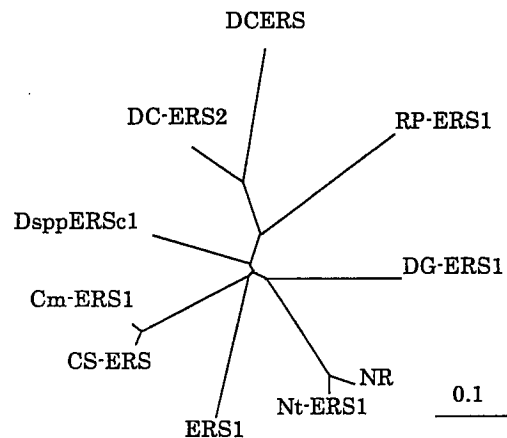


図 2. *DG-ERS1* と他の ERS 型エチレンレセプターの分子系統樹。

分子系統樹は近隣結合法 (neighbor-joining method) を用いて作成した。スケールは進化距離を示している。

Accession Nos: *DG-ERS1*, AF547624 (this study);

*ERS1* from *Arabidopsis*, U21952 (Hua et al., 1995);

*NR* from tomato, U38666 (Wilkinson et al., 1995);

*Nt-ERS1* from tobacco, AF039921 (Terajima et al., 2001);

*DCERS* from carnation, AF016250 (Charng et al., 1997);

*DC-ERS2* from carnation, AF034770 (Shibuya et al., 1998);

*DspERS1* from *Delphinium*, AB055429 (Kuroda et al., 2003);

*Cm-ERS1* from melon, AF037368 (Sato-Nara et al., 1999);

*CS-ERS* from cucumber, AB026499 (Yamasaki et al., 2000);

*RP-ERS1* from *Rumex palustris*, U63291 (Vriezen et al., 1997).

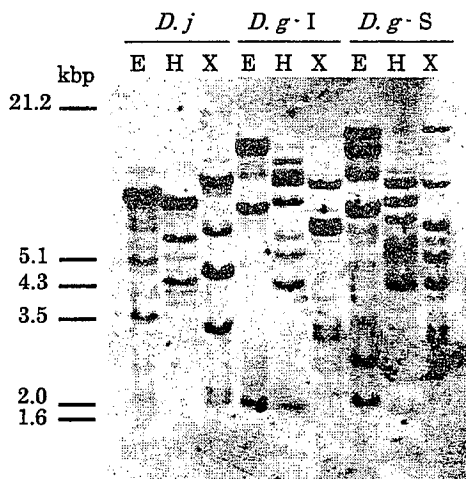


図 3. サザン解析。

キク葉から抽出した 30  $\mu$ g のゲノム DNA を, *Eco*R I, *Hind* III, *Xba* I で消化しアガロースゲル電気泳動した。メンブランに転写後, DIG ラベルした 300 bp の DNA プローブで検出した。

*D.j* (*Dendranthema japonicum*): 2 倍体野生キク 'リュウノウギク'

*D.g-I* (*D. grandiflorum* cv. 'Iwa-no-hakusen'): 6 倍体栽培キク '岩の白扇'

*D.g-S* (*D. grandiflorum* cv. 'Seiko-no-makoto'): 6 倍体栽培キク '精興の誠'

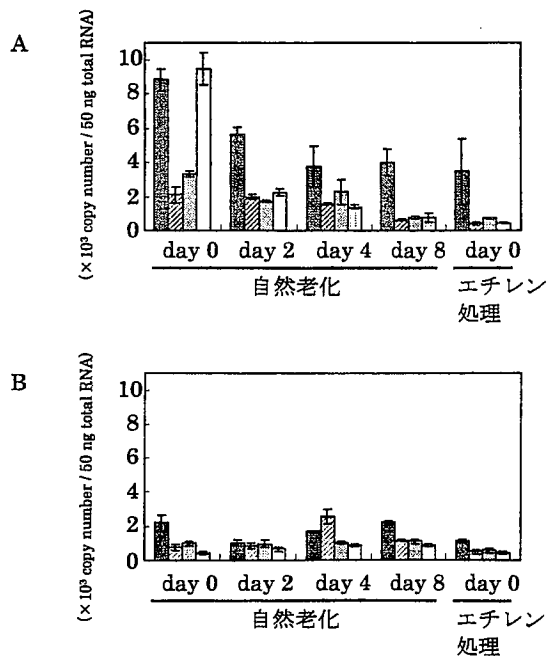


図 4. エチレン感受性 '精興の誠' とエチレン非感受性 '岩の白扇' における自然老化時およびエチレン処理時の *DG-ERS1* mRNA 量の変化。

満開時の切り花を 0~8 日間, 自然老化させた。あるいは, 満開時の切り花をエチレン処理 (2  $\mu$ l l<sup>-1</sup>, 12 時間) した。舌状化の花冠と総苞葉下から 0-15, 15-30, 30-45 cm の葉を採取し, total RNA を抽出した。real time PCR により *DG-ERS1* mRNA のコピー数を測定した。コピー数は, *DG-ERS1* cDNA を含むプラスミド (10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup> ng/ $\mu$ l) から作成した検量曲線から推定し, キクの actin mRNA のデータを用いて標準化した。A, '精興の誠'; B, '岩の白扇'。

■, 舌状化の花冠; □, 0-15 cm の葉; ▨, 15-30 cm の葉;

□, 30-45 cm の葉。



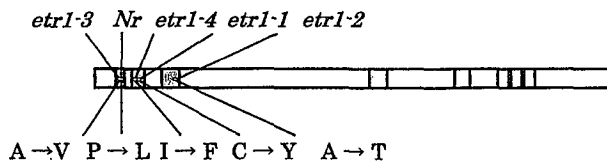


図 5. 一塩基置換による *mDG-ERS1* cDNA series の作成.  
*DG-ERS1* cDNA に, シロイヌナズナの *etr1-1*, *etr1-2*, *etr1-3*, *etr1-4*, および, トマトの *Nr* と同じ一塩基変異を, PCR による *in vitro* mutagenesis によって導入した. 一塩基置換によって生ずる変異エチレンレセプター (*mDG-ERS1*) のアミノ酸の変異は次の通りである.

*etr1-1* : Cys66→Tyr (TGT→TAT)  
*etr1-2* : Ala103→Thr (GCT→ACT)  
*etr1-3* : Ala32→Val (GCG→GTG)  
*etr1-4* : Ile63→Phe (ATT→TTT)  
*Nr* : Pro37→Leu (CCG→CTG)

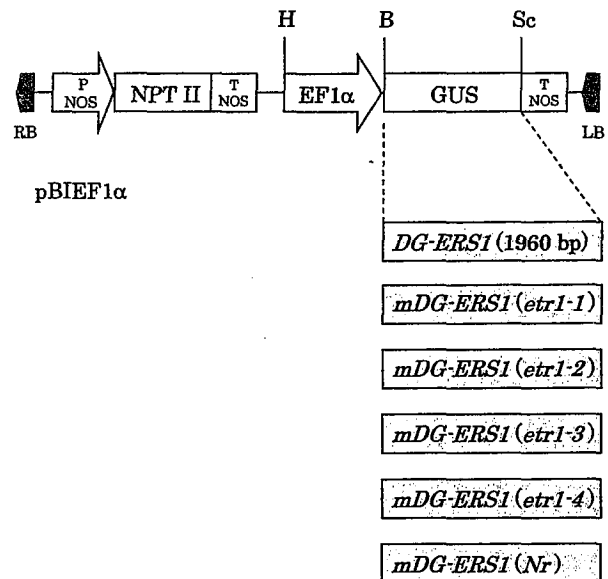


図 6. エチレン非感受性遺伝子組換え体の作出に用いたベクター.  
 pBIEF1α の GUS 遺伝子を, *DG-ERS1*, または, *mDG-ERS1* (*etr1-1*), *mDG-ERS1* (*etr1-2*), *mDG-ERS1* (*etr1-3*), *mDG-ERS1* (*etr1-4*), *mDG-ERS1* (*Nr*) と置き換えてベクターを作成した.  
 RB と LB, T-DNA のライトボーダーとレフトボーダー; PNOS, *A. tumefaciens* 合成酵素遺伝子プロモーター; TNOS, ノバリン合成酵素遺伝子ターミネーター; NPT II, カナマイシン (およびパロモマイシン) 耐性遺伝子; EF1α, タバコのペプチド鎖伸長因子遺伝子のプロモーター; H および B, Sc, *Hind* III, *Bam* HI, *Sac* I の制限酵素サイト.

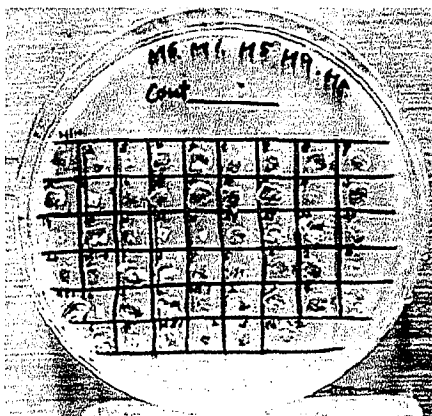


図 7. パロモマイシン耐性個体の選抜.  
 ‘セイマリ’ とパロモマイシン感受性の個体はカルス化しない. パロモマイシン耐性個体のみがカルスを形成する.

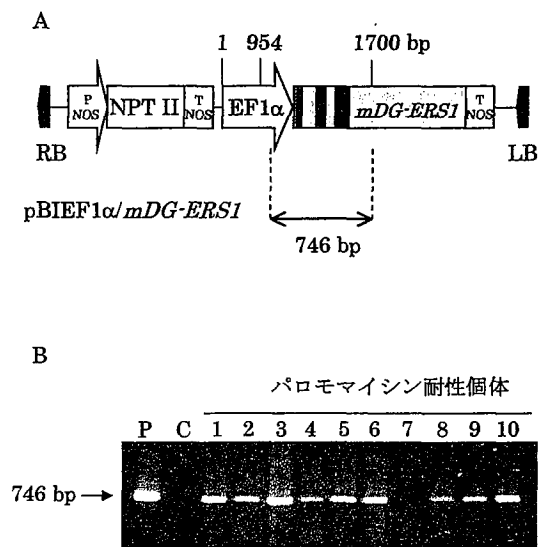


図 8. PCR による導入遺伝子の確認.  
 A, pBIEF1α/*mDG-ERS1* の構造と PCR による増幅部位. EF1α プロモーターと *DG-ERS1* (または, *mDG-ERS1*) にプライマーを設定し, EF1α::*DG-ERS1* または EF1α::*mDG-ERS1* 内の 746 bp の断片を増幅した.  
 B, 例として, EF1α::*mDG-ERS1* (*etr1-4*) 系統のパロモマイシン耐性個体を用いた PCR の結果を示した.  
 P, EF1α::*mDG-ERS1* (*etr1-4*); C, ‘セイマリ’.

表 1. 変異*DG-ERS1* cDNA (*mDG-ERS1* series) 導入キク作出過程のまとめ

EF1 $\alpha$ プロモーターに連結した変異遺伝子 (系統)	外植片数	再分化シユート数	パロモイシン耐性個体数	導入遺伝子確認個体数	形質転換効率 (%) *
<i>DG-ERS1</i>	1600	131	93	89	5.6
<i>mDG-ERS1</i> ( <i>etr1-1</i> )	1600	122	109	99	6.2
<i>mDG-ERS1</i> ( <i>etr1-2</i> )	1600	77	59	55	3.4
<i>mDG-ERS1</i> ( <i>etr1-3</i> )	1600	56	40	38	2.4
<i>mDG-ERS1</i> ( <i>etr1-4</i> )	1600	62	45	42	2.6
<i>mDG-ERS1</i> ( <i>Nr</i> )	1600	84	66	63	3.9

\*外植片数に占める導入遺伝子を有する個体の割合

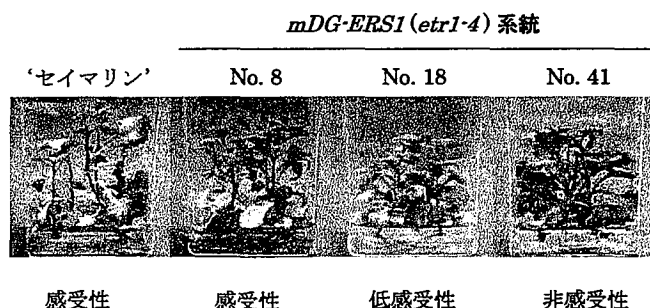


図 9. エチレン処理による*mDG-ERS1* (*etr1-4*) 系統の各個体の葉の黄化。

エチレン処理は  $5-10 \mu\text{l l}^{-1}$  で6日間行った。エチレンに対する応答は、感受性：下位葉～中位葉が黄化（‘セイマリン’，No. 8），低感受性：最下葉のみが黄化（No. 18），非感受性：黄化なし（No. 41），に区分した。

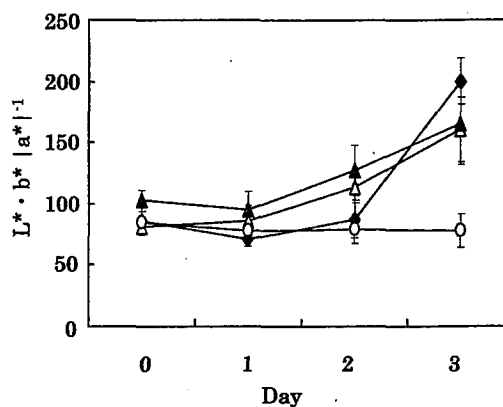


図 10. *mDG-ERS1* (*etr1-4*) 系統各個体の最下葉におけるエチレン処理による黄化度の変化。

エチレン，度色彩色差計による測定。  
◆，‘セイマリン’；△，No. 27（エチレン感受性）；▲，No. 14（エチレン低感受性）；○，No. 33（エチレン非感受性）

図 11. 外生エチレン処理による形質転換体の選抜。

各系統からランダムに40個体を選び、 $1-10 \mu\text{l l}^{-1}$ エチレンで6日間処理し、図9に示した黄化の程度によって感受性を区分した。（ ）内の数値は導入遺伝子が確認できなかった個体数。

□，エチレン感受性個体；□，エチレン低感受性個体；□，エチレン非感受性個体。

<i>DG-ERS1</i>	30		9	1
<i>mDG-ERS1 (etr1-1)</i>	33 (1)		7	
<i>mDG-ERS1 (etr1-2)</i>	29 (2)		9	2
<i>mDG-ERS1 (etr1-3)</i>	33 (2)		5	2
<i>mDG-ERS1 (etr1-4)</i>	24 (1)		8	8 (1)
<i>mDG-ERS1 (Nr)</i>	23		4	3
	10	20	30	40
	個体数			

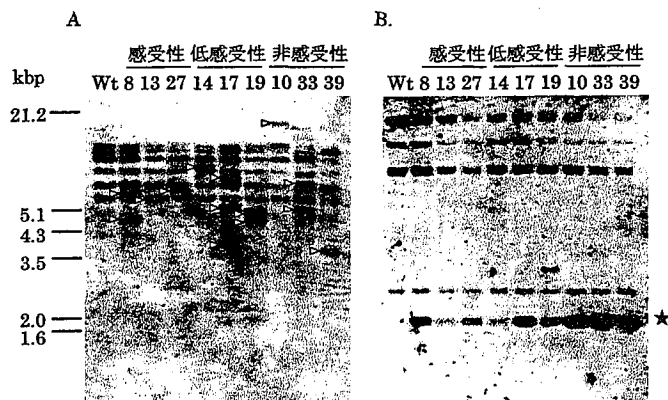


図 12. サザン解析による導入遺伝子の確認。  
 ‘セイマリン’および*mDG-ERS1 (etr1-4)*系統のエチレン感受性・低感受性・非感受性の各3個体(Noで表示)を材料にした。  
 A. *Hind* III, B. *Xba* I. 白抜き矢尻はセイマリン’で検出されなかったバンドを, ★は*Xba* I処理によって切り出される導入遺伝子由来のバンド1514 bpを示している。



‘セイマリン’ No. 13 No. 45 No. 33 No. 18 No. 23 No. 6 No. 3  
*mDG-ERS1 (etr1-4)* *mDG-ERS1 (etr1-1)* *mDG-ERS1 (Nr)*

図 13. 根の成長の比較。  
 各系統の個体のエチレン感受性は次の通りである。  
 ‘セイマリン’ (感受性) ; *mDG-ERS1 (etr1-4)*系統, No. 13 (感受性), No. 45 (低感受性), No. 33 (非感受性) ; *mDG-ERS1 (etr1-1)*, No. 18 (感受性), No. 23 (低感受性) ; *mDG-ERS1 (Nr)*系統, No. 6 (感受性), No. 3 (低感受性)。

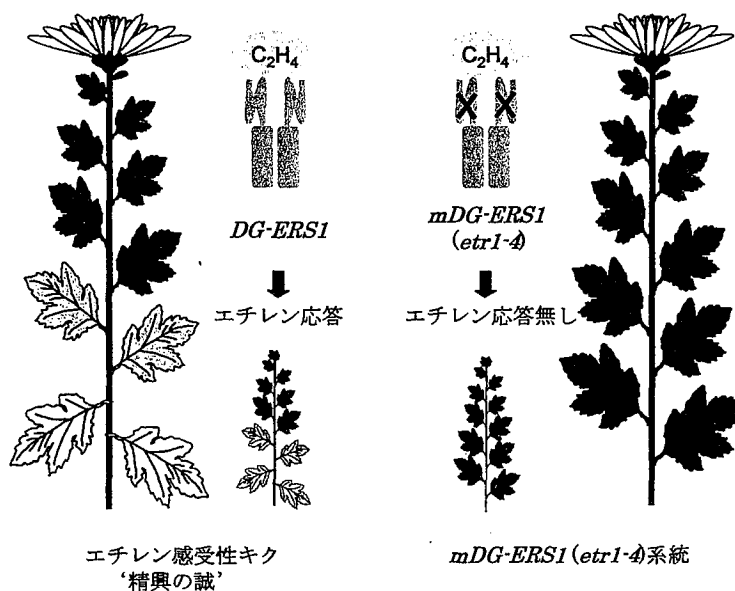


図 14. エチレンによるキク葉の老化と遺伝子組換えによる抑制 (本研究のイメージ)。

キクから1種類のエチレンレセプター遺伝子(*DG-ERS1* cDNA)を単離した。DG-ERS1はエチレン感受性キク‘精興の誠’の葉の黄化に関与している。変異*DG-ERS1* cDNA (たとえば, *mDG-ERS1 (etr1-4)*)を導入して, エチレン非感受性遺伝子組換えキクを作出した。

## 論文審査結果要旨

キクは、わが国を代表する切り花であり、最も出荷量が多く経済的に重要な園芸花きである。通常、切り花では花卉の寿命が鑑賞期間を決定するが、キクでは花の老化に先立ち葉の黄化が起こるため、葉の黄化が観賞期間を決定する。キクでは、エチレンが老化に関与しないと考えられてきた。しかし、近年、エチレンに対して感受性を有し、葉の黄化が促進される品種の存在が報告された。エチレンによるキク葉の黄化を抑制する方法として、エチレン非感受性形質転換体の作出が有効である、現在までに、シロイヌナズナの変異エチレンレセプター遺伝子 *etr1-1* を導入した、エチレン非感受性カーネーションやペチュニアが作出されている。しかし、キクでは他生物由来の導入遺伝子が発現しない事例が数多く報告されている。この問題は、キクのエチレンレセプター遺伝子由来の変異遺伝子を導入することによって回避できると考えられる。他方、キクにおいて外来遺伝子を安定して発現するプロモーターとして、タバコ由来のペプチド鎖伸長因子 1  $\alpha$  遺伝子のプロモーター (EF1  $\alpha$  プロモーター) が開発されている。本研究では、エチレンによるキク葉の黄化抑制を目的として、エチレンに対するキクの感受性をエチレンレセプター遺伝子に着目して解析し、さらに、変異エチレンレセプター遺伝子を導入したエチレン非感受性遺伝子組換えキクの作出を行った。

キクからエチレンレセプター遺伝子 (*DG-ERS1*) の cDNA をクローニングした。*DG-ERS1* mRNA 量は、エチレン感受性品種 ‘精興の誠’ の自然老化時およびエチレン処理時に舌状花の花冠および葉において減少した。エチレン非感受性品種 ‘岩の白扇’ ではこのような減少は観察されなかった。*DG-ERS1* はエチレン感受性品種 ‘精興の誠’ において、エチレン受容に働いていることが推定された。

*DG-ERS1* cDNA にシロイヌナズナの *etr1-1*, *etr1-2*, *etr1-3*, *etr1-4*, およびトマト *Nr* の変異と同様の一塩基置換を導入した変異エチレンレセプター遺伝子 *mDG-ERS1* シリーズを EF1  $\alpha$  プロモーターに繋いだコンストラクトを作成し、キク品種 ‘セイマリン’ に導入して遺伝子組換え体を作成した。エチレン処理によって ‘セイマリン’ では下位～中位葉が黄化した。*mDG-ERS1* シリーズを導入した各形質転換体のパロモマイシン耐性系統は、‘セイマリン’ と同程度に葉が黄化した系統 (エチレン感受性)、最下葉のみが黄化した系統 (エチレン低感受性)、黄化が一切起こらなかった系統 (エチレン非感受性) に区別された。各形質転換体のうち、*mDG-ERS1* (*etr1-4*) 形質転換体で最も多くのエチレン非感受性系統が得られた。この結果から、*mDG-ERS1* (*etr1-4*) が最も効率よくエチレン非感受性を付与することを明らかにした。

本研究によって、エチレンレセプター遺伝子 *DG-ERS1* がエチレン受容に働いていることを明らかにし、さらにエチレン非感受性遺伝子組換えキクの作出に成功した。

以上のように本研究の成果は、エチレン非感受性キクの作出を通じて、効果的にエチレン非感受性を付与するエチレンレセプター遺伝子の変異部位について新たな知見を得るとともに、今後、他の園芸花きにおけるエチレン非(低)感受性形質転換体作出への応用も期待される。よって、審査員一同は、本論文に対し博士 (農学) の学位を授与するに値する内容であると判断した。